Histologische, histochemische und histoautoradiographische Untersuchungen über die Wirkung von 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym auf den normalen und denervierten Skeletmuskel der Maus

Leopold Husch

1971

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

HISTOLOGISCHE, HISTOCHEMISCHE UND HISTOAUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON 5,6 DIMETHYLBENZIMIDAZOL-COBAMID-COENZYM AUF DEN NORMALEN UND DENERVIERTEN SKELETMUSKEL DER MAUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Leopold H u s c h
aus Vierkirchen bei Dachau

München 1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Mittelbach
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1971

M E I N E N E L T E R N G E W I D M E T

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I.	EINLEITUNG	5
II.	DAS COBAMID-COENZYM (5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym)	6
	a) Struktur und Funktion	6
	b) Klinische Erfahrungen	8
III.	MATERIAL UND METHODIK	10
IV.	ERGEBNISSE	14
	a) Histologie	14
	b) Histochemie	18
	c) Histoautoradiographie	22
V.	DISKUSSION	23
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	28
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	29

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0071

I. E I N L E I T U N G

Über den Einfluß anaboler Steroide auf den normalen und denervierten Skeletmuskel der Maus haben bereits MITTELBACH, PONGRATZ (48) berichtet. Sie konnten zeigen, daß unter Gabe von anabolen Hormonen der normale Skeletmuskel deutlich hypertrophiert und der Atrophie des denervierten Muskels weitgehend entgegengewirkt wird. Dabei ist bei einer Behandlung mit anabolen Hormonen der myotrope Effekt auf eine Steigerung der Proteinsynthese zurückzuführen (37,41,35). Trotz teilweise guter Erfahrungen bei Erkrankungen, die mit mangelhaftem Eiweißanabolismus einhergehen, zwingen oft die unerwünschten Nebenwirkungen wie Virilisierung, Gewichtszunahme und irreversible Stimmveränderungen zur Einschränkung der Therapie.

Dies war der Anlaß für die vorliegende Untersuchung über die Wirkung von 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym, einem nicht hormonalen Proteinanabolikum (54,67) auf den normalen und denervierten Skeletmuskel der Maus.

II. D A S C O B A M I D C O E N Z Y M

(5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym)

a) Struktur und Funktion

Nachdem die Isolierung von 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym in kristalliner Form gelungen war (4,46), folgte bald darauf die Röntgenstrukturanalyse, die den vollständigen Aufbau des Cobamid-Coenzyms klären konnte (Abb. 1). Es gleicht im wesentlichen dem Vitamin B_{12} (Cyanocobalamin), hat aber an Stelle der Cyangruppe eine Adeninnucleosidgruppe (3,44,31,34,69). Wie das Vitamin B_{12}, zeichnet es sich durch den Gehalt an Cobalt aus, das mit einer Haupt- und vier Nebenvalenzen an Stickstoffatome gebunden ist; die zweite Hauptvalenz trägt das Nucleosid, das mit C5' die Bindung zum zentralen Cobaltatom aufbaut und teilweise Ionencharakter besitzt.

Biochemisch gesehen gehört das 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym zu einer Reihe von Coenzymen, die als Katalysatoren im intermediären Stoffwechsel fungieren, was zuerst bei dem Bakterium Clostridium tetanomorphum erkannt wurde (5,70).

Später zeigten eine Reihe von experimentellen Untersuchungen an Reticulocyten des Kaninchens und an Leberpräparaten der Ratte, daß die spezifische Aktivität der Plasmaproteine durch Cobamid-Coenzym gesteigert wird,

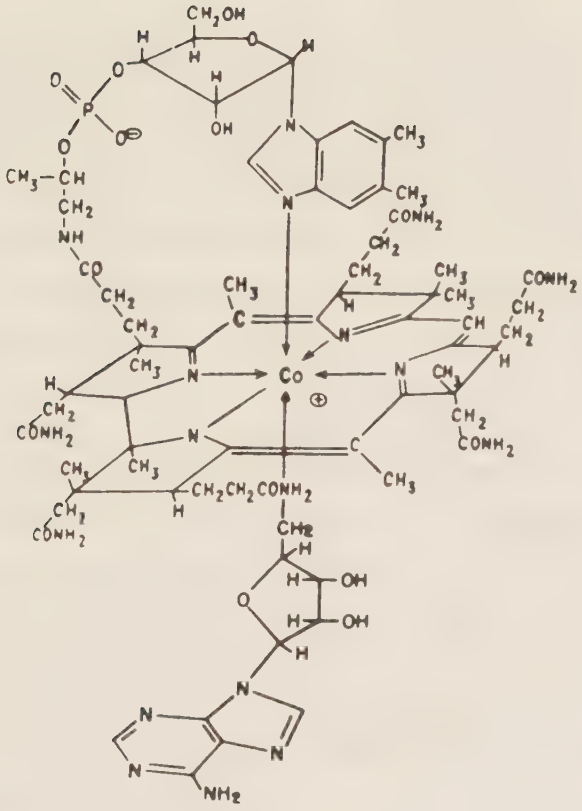


Abb. 1 Struktur des Cobamid-Coenzyms

d. h. daß der Einbau von Aminosäuren bei behandelten Tieren schneller abläuft als bei unbehandelten Kontrolltieren (47). Ebenso fordert das Ergebnis einer Versuchsreihe mit Hühnerembryonen den fördernden Einfluß des B_{12}-Coenzyms auf die Eiweiß- und Nucleinsäuresynthese (14).

b) Klinische Erfahrungen

Überblickt man die Veröffentlichungen über den therapeutischen Einsatz von Cobamid-Coenzym, so sieht man, daß es ähnlich dem Vitamin B_{12} zur Anwendung kommt. Wie dieses wurde es vielfach zur Behandlung von Frühgeburten eingesetzt (61,45), um den Gewichtsanstieg, der ein Maß für den Entwicklungs- und Wachstumsvorgang darstellt, zu verbessern. MARTIN und BEAUVIEUX (45) berichten über ein gutes Ergebnis mit Cobamid-Coenzym bei drei Gruppen von Kindern, die disponiert schienen, auf eine zu erwartende anabolische Wirkung besonders anzusprechen. Es handelt sich um Frühgeborene, die trotz Muttermilchernährung ihr Geburtsgewicht nicht vermehrten, ferner um ausgetragene Neugeborene, bei denen die Gewichtskurve kaum anstieg und schließlich um hypotrophische, sonst aber gesunde Säuglinge, deren Körpergewicht ebenfalls nur langsam zunahm. DIDIER (16) wandte das Coenzym B_{12} bei Kindern im Alter von 1 - 29 Monaten, die eine Anorexie oder mangelnde Gewichtszunahme hatten, ebenfalls erfolgreich an. Auch FONTAINE und FABRIAUX (24) berichteten über gute Erfolge bei 37 Kindern im Alter zwischen 18 Monaten und 10 Jahren. Andere Autoren (67,24,6,22,54) haben bei erwachsenen zum Teil schwerkranken Patienten sehr befriedigende Behandlungserfolge festgestellt. So waren die Resultate bei alter Tuberkulose, bei respiratorischer Insuffizienz,

bei schlecht ernährten Alkoholikern, bei Rekonvaleszenten nach chirurgischen Eingriffen oder nach strahlenbehandelten neoplastischen Erkrankungen besonders gut.

Einstimmig positiv beurteilen sämtliche Autoren die Verträglichkeit des Cobamid-Coenzyms. Es konnten keine Störungen von Seiten des Magen-Darm-Trakts, auch keine allergischen Hautreaktionen und keine hämatologisch faßbaren Schädigungen festgestellt werden.

III. M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

Vierzig männliche Albinomäuse, die als Versuchstiere dienten, wurden in vier Gruppen zu je 10 Mäusen eingeteilt. Den Gruppen A und B (mit einem Durchschnittsgewicht von 30 Gramm pro Maus) wurden in Äthernarkose der n. ischiadicus des rechten Hinterbeines in einer Länge von 0,5 bis 1 cm reseziert, um einer eventuellen späteren Reinnervation vorzubeugen. Der Schnitt wurde anschließend mit Nähten versorgt. Der Eingriff und die nachfolgende Versuchszeit wurden von allen Tieren gut überstanden. Bei allen denervierten Tieren konnte jedoch durch die neurale Atrophie ein deutliches Nachziehen des rechten Hinterbeines beobachtet werden. Die beiden Gruppen C und D wurden nicht denerviert.

Von dem Tag der Denervation an wurden die Gruppen B und D, also eine denervierte und nicht denervierte Gruppe, zweimal wöchentlich mit 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym gespritzt. Sie erhielten jeweils 50 γ subcutan am Rücken injiziert (= 0,25 ml einer mit steriler physiologischer Kochsalzlösung versetzter Ampulle Cobamid-Coenzym, die 1000 γ festes 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym enthält). Daraus ergibt sich eine Dosierung von 550 γ/kg/Tag.

Nach achtwöchiger Versuchsdauer wurden die Tiere aller Gruppen mit Äther getötet und durch Dekapitierung

entblutet.

Eine Stunde vor Tötung wurden jeweils zwei Versuchstieren aus jeder Gruppe 4 µC ^{3}H-Thymidin / g Körpergewicht mit einer spezifischen Aktivität von 5,0 C / mM intraperitoneal appliziert. Dann wurden folgende Muskel unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen entnommen:

m. gastrocnemius des rechten Hinterbeines
m. gastrocnemius des linken Hinterbeines.

Die gewonnenen Muskeln wurden histologisch, histochemisch und histoautoradiographisch untersucht.

Zur histologischen Aufarbeitung wurde das Untersuchungsmaterial im Anschluß an die Formalin-Fixierung nach der Methode von HIRSCH und BOELLAARD (29) modifiziert von ERBSLOEH (21) in Methacrylat eingebettet, aufgeblockt und 7 µ dicke Schnitte hergestellt. Von jedem Muskel wurden mehrere Präparate angefertigt, die wir für die histologische Untersuchung nach van GIESON färbten.

Die Ausmessung der Muskelfaserquerschnitte erfolgte an einem genau orthograd getroffenen Schnitt. Dabei wurden jeweils 1000 Muskelfasern ausgezählt und die erhaltenen Werte auf 100 Fasern bezogen. Bei den polygonalen Querschnitten wurde so vorgegangen, daß mehrere Durchmesser bestimmt und dann daraus das arithmetische Mittel errechnet wurde.

Ein weiterer Teil des Muskelmaterials wurde zur histochemischen Aufarbeitung verwendet. Hierfür wurden die entnommenen Muskeln in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in der Tiefkühltruhe aufbewahrt, um den Aktivitätsverlust der Enzyme so gering wie möglich zu halten. Nachdem nun 10 bis 20 μ dicke Schnitte von den Gruppen C und D im Kryostaten angefertigt waren, wurde die Succinatdehydrogenase (SDH) nachgewiesen (49). Mit Hilfe des Okularmikrometers wurde auch diesmal an genau orthograd getroffenen Fasern der Durchmesser der Fasertype I (rote Muskelfasern) und der Fasertype II (weiße Muskelfasern) bestimmt. Dabei wurde genauso verfahren, wie bereits oben beschrieben.

Der mit ^{3}H-Thymidin markierte Teil des Untersuchungsmaterials aus allen vier Gruppen wurde zur Histoautoradiographie verwendet. Nach der Fixierung in gepuffertem Formalin wurde der histologische Teil der Aufarbeitung ebenfalls nach HIRSCH und BOELLAARD (29) durchgeführt. Die angefertigten Schnitte (3 μ dick) wurden auf sorgfältig gereinigten Objektträgern, die mit Eiweißglyzerin als Bindemittel präpariert wurden, aufgezogen und nach der autoradiographischen Methode von CARO (12), PRESCOTT (55) und OEHLERT (51) mit Ilford K 5 (Ilford Ltd., Ilford/England) beschichtet und nach vierzehntägiger Expositionszeit für die Herstellung von Autoradiogrammen verwendet. Zur Entwicklung der Filmschicht wurde Kodak D 19 (3 Minuten

Entwicklungszeit) genommen. Die Fixierung erfolgte mit einer Lösung, zu der in einem Liter Natriumthiosulfat (Dichte 1,19) 12,5 g Natriumsulfit (wasserfrei) und 10 ml Essigsäure gegeben wurde. Die so gewonnenen Autoradiogramme wurden mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Zur lichtmikroskopischen Auswertung der Autoradiogramme wurde der ^{3}H-Index durch Ermittlung des Verhältnisses von markierten zu unmarkierten Muskelkernen bestimmt, wobei jeweils 50.000 Kerne in den einzelnen Präparaten pro Gruppe ausgezählt wurden. Dies ist bei der geringen Anzahl an markierten Kernen unbedingt notwendig. Als markiert wurden nur Kerne angesehen, die mindestens 10 und mehr Silberkörner aufwiesen. Einschränkend ist zur Methode zu sagen, daß es teilweise unmöglich ist, eindeutig subsarkolemmal gelegene und mit Silberkörnern bedeckte Muskelkerne von markierten Kernen der Endomysialsepten zu unterscheiden, daher muß die sich daraus ergebende Fehlerquelle bei der Beurteilung und Verwertung der Zählergebnisse berücksichtigt werden.

IV. E R G E B N I S S E

Die histologische Untersuchung des denervierten Muskels läßt eine deutliche Atrophie der Muskelfasern erkennen. Es zeigt sich neben einer Abrundung der im normalen Muskel polygonalen Faserquerschnitte auch ein erheblich verkleinerter Durchmesser, nahezu die Hälfte des Durchmessers des normalen Muskels der Kontrolltiere.

Mehrere Autoren (2,8,13,64,27,32,71,36,57) berichteten in allen Einzelheiten über den zeitlichen Ablauf des atrophischen Prozesses. So kommt es eine Woche nach Nervendurchtrennung zur Abrundung der subsarkolemmalen Kerne, nach zwei zur Vergrößerung und Hyperchromie. An den kleinen Gefäßen fällt eine starke Blutfüllung und eine verstärkte Wanddicke auf. Vier Wochen nach Denervierung zeigt sich ein Rückgang der Faserdurchmesser, wobei aber die Quer- und Längsstreifung immer noch gut erhalten bleibt. Zu diesem Zeitpunkt scheinen aber bereits die Muskelkerne relativ vermehrt zu sein (63,71). Eine einheitliche Meinung darüber, ob es sich um eine relative oder absolute Kernvermehrung handelt, gibt es derzeit noch nicht. Nach acht Wochen haben die Muskelfasern nur noch etwa die Hälfte ihres normalen Durchmessers und der Unterschied zwischen roten und weißen Fasern verschwindet (36). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen kam man zu der heute gültigen Auffassung, daß es sich

bei der Atrophie um einen Abbau der spezifischen fibrillären Muskelproteine handelt d. h. um den Verlust der regelmäßigen fibrillären Feinstruktur (68).

In unseren Untersuchungen lag nun das zahlenmäßige Maximum der Verteilung der Muskelfaserquerschnitte beim normalen Mäusemuskel, wie aus der Tabelle 1 bzw. noch eindrucksvoller aus der graphischen Darstellung (Abb. 2) ersichtlich ist, bei 40 μ und beim denervierten Muskel bei 24 μ. Dies stimmt gut mit den Messungen von MITTELBACH und PONGRATZ (48) überein. Unter der Applikation von 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym ist sowohl am normalen als auch am denervierten Muskel ein geringfügiger Anstieg des Verteilungsmaximums zu erkennen. Dies läßt sich aus den Binominalkurven, so stellt sich nämlich die Verteilung der Muskelfaserquerschnitte dar, gut ersehen. Dabei kommt es unter dem Einfluß von Cobamid-Coenzym beim normalen Muskel zu einer leichten Abflachung und Rechtsverlagerung der Kurve. Die Verteilungskurve des denervierten Muskels hingegen ist stark links versetzt, verlagert sich aber unter der Einwirkung von 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid Coenzym ebenfalls ganz geringfügig nach rechts und außerdem wird der Kurvenverlauf etwas verbreitert. Der Vergleich dieser Kurvenverläufe läßt darauf schließen, daß der normale Muskel unter dem Einfluß von Cobamid-Coenzym scheinbar zu einer leichten Hypertrophie

Faser Ø in µ	VERTEILUNG DER MUSKELFASERDURCHMESSER BEZOGEN AUF JEWEILS 100 FASERN			
	norm Muskel	norm. Muskel + Cob. Coenzym	denerv Muskel	denerv Muskel + Cob. Coenzym
12			1	
16			6	1
20			17	9
24	2		26	14
28	4	2	19	23
32	11	6	14	22
36	17	11	8	17
40	31	18	5	8
44	17	22	3	3
48	10	19	1	2
52	5	11		1
56	2	6		
60	1	3		
64		1		
68		1		

Tabelle 1: Zahlenmäßige Verteilung der Muskelfaserdurchmesser (bezogen auf jeweils 100 Muskelfasern).

Verteilung der Muskelfaserdurchmesser des normalen und denervierten Skeletmuskels unter Cobamid-Coenzym

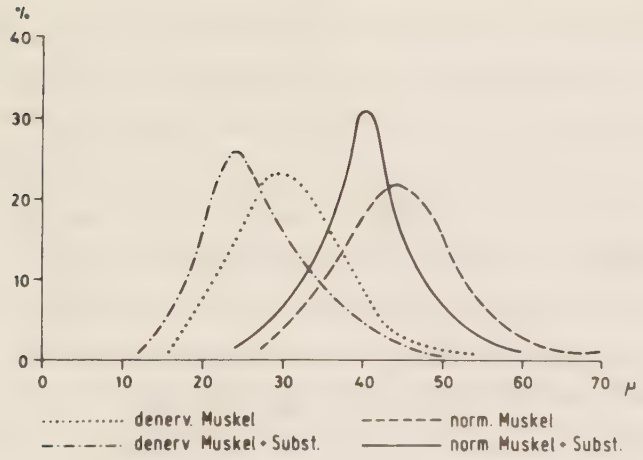


Abb. 2: Graphische Darstellung der Verteilung der Muskelfaserdurchmesser des normalen und denervierten Muskels unter Cobamid-Coenzym.

angeregt wird und der denervierte Muskel unter dieser Therapie etwas weniger rasch atrophiert.

Histochemisch zeigte die Succinatdehydrogenase-Reaktion an dem untersuchten m. gastrocnemius das typische Bild des Schachbrettmusters, das daher rührt, daß der m. gastrocnemius ein gemischter Muskel ist, der sich im wesentlichen durch zwei verschiedene Fasertypen, die sich histochemisch gut differenzieren lassen, auszeichnet. Es handelt sich hierbei um die größeren weißen Fasern vom Typ II und die kleineren roten Fasern vom Typ I. Hinzu kommt noch die sogenannte intermediäre Faser, die in Größe und anderen Charakteristiken der Typ II-Faser ähnlich ist (62). Diese Befunde gelten allgemein für die gemischte Säugetier- und Vogelmuskulatur (1,17,50,52). Die hauptsächlich im m. gastrocnemius vorkommenden weißen Typ II-Fasern haben im Vergleich zu den roten Typ I-Fasern, die im m. soleus vorherrschen, einen größeren Faserdurchmesser, höheren Glykogengehalt (43,62), weniger Mitochondrien und weniger Myoglobin (42). Histochemisch zeigen sie auch eine schwächere oxydative Enzymreaktion (17), wohl aber eine stärkere Phosphorylase und Adenosintriphosphatreaktion (53,40,58). Die Typ I-Fasern hingegen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie besonders reich an intramitochondral lokalisierten oxydativen Enzymen sind und eine hohe Esteraseaktivität aufweisen (15,17,18). Am normalen Muskel zeigen die Phosphorylase und die ATPase

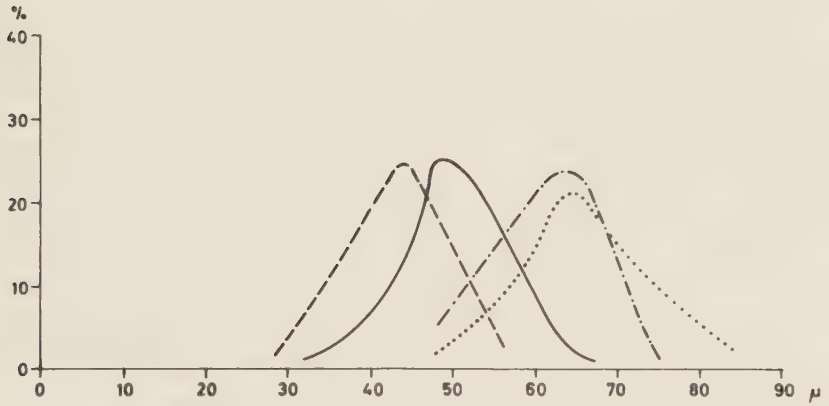
ein umgekehrtes Verhalten wie die oxydativen Enzyme (SDH, CCO) d. h. die Typ II-Fasern geben eine stärkere und die Typ I-Fasern eine schwächere Reaktion (48). Der denervierte Skeletmuskel weist im ganzen gesehen eine abgeschwächte Gesamtaktivität der oxydativen Enzyme auf, während die Phosphorylase und die ATPase etwas verstärkt sind. Bei den in dieser Arbeit mit 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym behandelten nicht denervierten Versuchstieren zeigte sich im Vergleich zum normalen unbehandelten Tier eine etwas verstärkte SDH-Aktivität. Die nun durch Okularmikrometrie am behandelten und unbehandelten normalen Skeletmuskel gewonnenen Ergebnisse lassen erkennen, daß sich die Verteilung der Durchmesser der beiden Fasertypen ebenfalls jeweils in Form einer Binominalkurve darstellen (Abb. 3). Beim behandelten und unbehandelten denervierten Muskel ist wegen des uniformen histochemischen Musters ein Ausmessen der Durchmesser nicht möglich. Die Reaktion der oxydativen Enzyme ist beim denervierten Muskel abgeschwächt.

Wie nun aus der Tabelle 2 bzw. noch deutlicher aus der graphischen Darstellung ersichtlich wird, liegt das Maximum der Verteilung für die Typ I-Faser bei 64 μ. Unter der Einwirkung von 5,6 Dimethylbenzimidazol-Cobamid-Coenzym ist bei der Typ I-Faser ein geringer Abfall, bei der Typ II-Faser ein gleichbleibendes Verteilungsmaximum zu erkennen. Dabei zeigt das Kurvenbild, daß am normalen

Faser Ø in µ	NORM. MUSKEL		NORM. MUSKEL + COB.-COENZYM	
	Fasertyp I	Fasertyp II	Fasertyp I	Fasertyp II
28			1	
32	1		9	
36	2		12	
40	7		20	
44	11		25	
48	26	2	19	5
52	23	5	11	11
56	15	9	3	16
60	12	15		20
64	2	22		24
68	1	17		16
72		13		7
76		9		1
80		6		
84		2		

Tabelle 2: Zahlenmäßige Verteilung beider histochemischer Fasertypen.

Verteilung beider histochemischer Fasertypen



———Fasertyp I u.·····Fasertyp II d.norm.Muskels
– – – –Fasertyp I u.–·–·–Fasertyp II d.norm.Muskels+Cob.Coenz.

Abb. 3: Graphische Darstellung der Verteilung beider histochemischer Fasertypen.

behandelten Muskel der Kurvenverlauf der Typ I-Faser ein wenig nach links gerückt ist, der der Typ II-Faser nahezu deckungsgleich mit der Kurve der Typ II-Faser des unbehandelten Muskels ist.

Die histoautoradiographische Untersuchung zeigt am normalen Muskel, wie mehrfach beschrieben (7,33), nur wenig DNS-synthetisierende Zellen. Wir konnten zwei markierte Muskelkerne bei 50.000 gezählten Kernen finden. Der denervierte, nicht intakte Muskel wies 4 markierte Muskelfaserkerne und einige markierte Phagocyten und Adventitiazellen auf. Bei den mit Cobamid-Coenzym behandelten Tieren ergab sich ein Zuwachs an markierten Muskelkernen, beim normalen Muskel von 9 und beim denervierten von 14. Auch bei den behandelten denervierten Tieren waren wiederum einige markierte Adventitiazellen zu finden. Besonders auffallend waren die zum Teil auftretenden Kernvergrößerungen vorwiegend markierter Kerne. Sie zeigten ein erheblich größeres Volumen als die normalen Zellkerne.

ANZAHL DER MARKIERTEN KERNE BEI AUSZÄHLUNG VON JEWEILS 50 000 MUSKELKERNEN			
norm Muskel	norm. Muskel + Cob. Coenzym	denerv. Muskel	denerv Muskel + Cob. Coenzym.
2	11	4	18

Tabelle 3: Anzahl der markierten Muskelkerne bei Auszählung von jeweils 50.000 Kernen.

V. D I S K U S S I O N

Eine achtwöchige Versuchsdauer läßt am denervierten Muskel deutliche morphologische Veränderungen erkennen. Dies zeigt sich vor allem am Verteilungsmaximum der Faserdurchmesser (atrophischer Muskel 24 μ ; normaler Muskel 40 μ). Am normalen Muskel, der unter dem Einfluß von Cobamid-Coenzym steht, ist ein leichter Anstieg des Maximums der Verteilung der Faserdurchmesser zu beobachten. Ebenso wird beim behandelten denervierten Muskel der atrophische Prozess etwas hintangehalten (Verteilungsmaximum 28 μ). Die geschilderten Veränderungen beim denervierten Muskel lassen sich, wie aus mehreren Veröffentlichungen hervorgeht (27,28,38,39,59), damit erklären, daß der Muskel nach Denervation einen erheblichen Proteinverlust erfährt d. h. der denervierte Muskel atrophiert, weil es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts des Eiweißstoffwechsels in Richtung kataboler Prozesse kommt und weil die Synthese von spezifischen Proteinen gestört ist und diese offensichtlich vom Neuron gesteuert wird (26). Der Wassergehalt des Muskels wird dabei nicht vermindert, eher noch leicht erhöht (23,28,27). Dieser Gewichtsverlust nach der Nervendurchtrennung ist zwischen dem 3. und 14. Tag wesentlich größer als zwischen dem 15. und 30. Tag (28). Er beträgt nach einem Monat ca. 30 % und nach zwei Monaten zwischen 50 und 60 % des ursprünglichen Normalgewichts (63).

HINES und KNOWLTON betrachteten den Proteinschwund nach Denervation noch differenzierter und fanden, daß die Strukturproteine zu denen das Aktomyosin gehört, das aus Aktin und Myosin besteht, unterschiedlich schnell abnehmen. So beträgt die Abnahme des Myosins am 5. Tag bereits 20 %, wird aber in der folgenden Zeit langsamer reduziert. Das Aktin des Muskels bleibt die ersten zehn Tage unverändert, wird dann aber fünf Tage lang bis zu 50 % vermindert, um sich in der Folgezeit der Reduktionsgeschwindigkeit der übrigen Muskelproteine anzupassen.

An weiteren Veränderungen finden sich am atrophischen Muskel eine relative Zunahme des Fettgehalts, absolut gesehen bleibt er jedoch bei schwindendem Muskeleiweiß unverändert (27). Ferner werden das Kalium (56), ATP, Kreatin und Phosphokreatin erheblich vermindert (28).

Die histochemische Reaktion zeigt am denervierten Muskel, wie bereits beschrieben, eine Abschwächung der oxydativen Enzyme; dies trifft vor allem fur die Fasern vom Typ I zu. Die glycolytischen Enzyme hingegen erfahren eine gewisse Steigerung (48). Bei den in dieser Arbeit mittels Okularmikrometrie bestimmten Durchmessern der beiden Fasertypen ergab sich am normalen Muskel für die Fasertype I ein Verteilungsmaximum von 48 μ, das der Typ II-Fasern lag bei 64 μ. Beim normalen mit Cobamid-Coenzym behandelten Muskel lagen die Werte im Unterschied dazu bei der Typ

I-Faser bei 44 µ und bei der Typ II-Faser wie beim normalen Muskel bei 64 µ. Dieser Befund steht nicht im Widerspruch zu den histologischen und histoautoradiographischen Ergebnissen, da die Abweichung noch innerhalb der Fehlergrenze liegt, doch kann er auf keinen Fall eine eventuell geringe anabole Wirkung des Cobamid-Coenzyms erhärten. Hierfür müßten wahrscheinlich die Faserdurchmesser, zumindest der Typ II-Fasern eine Zunahme erfahren, denn die Wirkung eines Anabolikums auf den normalen Muskel spiegelt sich immer in der Hypertrophie der Faser wieder. In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, daß BROOKE und ENGEL (9,19,10,11,20) die Fasertypen im menschlichen Skeletmuskel mit Hilfe der Photographie und Planimetrie flächenmäßig differenzieren. Diese Methode scheint eine relativ große Genauigkeit zu garantieren, da sie jede subjektive Fehlerquelle ausschaltet. Sie kann im Gegensatz zu unserer Meßmethode kleinere Unterschiede genauer bestimmen und damit geringere Effekte bereits erfassen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen histoautoradiographischen Ergebnisse lassen sich durchaus in die übrigen Befunde einordnen. Die Zunahme an markierten Muskelkernen im behandelten normalen und denervierten Muskel von zwei auf elf bzw. vier auf achtzehn bei jeweils 50.000 gezählten Kernen, deutet auf einen erhöhten Kernstoffwechsel bei den unter Wirkung von Cobamid-Coenzym stehenden

Muskeln hin. Welche Konsequenzen diesem Befund zukommen, erscheint allerdings fraglich. Es bleibt zu diskutieren, ob sich aus einer Kernaktivierung sekundär auch ein proteinanaboler Effekt ableiten läßt. Man muß dabei aber betonen, daß ja keinerlei direkter Zusammenhang zwischen der DNS-Synthese und der Proteinsynthese des ruhenden Kernes besteht, so daß der Befund nur als Indiz, nicht als Beweis gewertet werden kann. Man könnte allenfalls die in unseren Autoradiogrammen vielfach auftretenden Kernvergrößerungen im Sinne eines funktionellen Kernödems (BENNINGHOFF) deuten, das autoradiographischen Untersuchungen zufolge, parallel zu der Protein- und RNS-Neubildung im Zellkern geht. Damit wäre also das funktionelle Kernödem der morphologische Ausdruck einer gesteigerten Syntheseleistung des Zellkerns (51). Die RNS-Neubildung steht aber wiederum in Relation zur cytoplasmatischen Eiweißneubildung, was zu der Annahme Anlaß gibt, daß zwischen der Kerngrößenveränderung und der Proteinneubildung ein sichtbarer Zusammenhang besteht.

Nun drängt sich noch die Frage auf, wie denn die anabole Wirkung von Cobamid-Coenzym zu erklären ist, falls überhaupt am Muskel von einer derartigen Wirkung des Coenzyms gesprochen werden kann, da ja die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede aufzeigen und zum Teil noch innerhalb der Fehlergrenze liegen. Als Vitamin B_{12}-Abkömmling müßte das Cobamid-Coenzym, ähnlich wie das bei zahlreichen

Fermenten als Coenzym wirkende Vitamin B_{12}, an den Auf- und Abbaureaktionen des intermediären Stoffwechsels beteiligt sein (60) und einen fördernden Einfluß auf die Eiweißsynthese haben (65,66). Dies soll dadurch geschehen, daß vermehrt Aminosäuren in das Körpereiweiß eingebaut werden. Man stellt sich das so vor, daß das Vitamin B_{12} als Trägersubstanz für die Aminosäuren wirkt und diese wahrscheinlich nach Carboxyl-Aktivierung durch ATP und Pyrophosphataustausch, auf die Matritze übertragen werden (25,30).

Vergleicht man nun die Ergebnisse dieser Untersuchung mit den Ergebnissen der Arbeit von MITTELBACH/PONGRATZ (48), so sieht man ganz deutlich, daß die Wirkung der anabolen Steroide auf den normalen und denervierten Muskel wesentlich stärker zum Tragen kommt, als mit Cobamid-Coenzym. Die oben genannten Autoren konnten ein deutliches Hintanhalten der Denervationsatrophie sowie eine signifikante Hypertrophie am behandelten normalen Muskel beobachten, was wir im Gegensatz dazu nicht unter der Einwirkung von Coenzym B_{12} feststellen konnten; bei uns liegen nahezu sämtliche Ergebnisse innerhalb der Fehlergrenze. Der erwartete Erfolg konnte sich also in keiner Weise bestätigen lassen.

VI. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Es wird über Struktur und Funktion sowie über therapeutische Erfahrungen mit Cobamid-Coenzym anhand der vorliegenden Literatur berichtet.

2. An männlichen Albinomäusen wurde über eine Versuchsdauer von acht Wochen die Wirksamkeit von Cobamid-Coenzym sowohl am normalen als auch am denervierten m. gastrocnemius histologisch, histochemisch und histoautoradiographisch untersucht.

3. Es konnte weder am normalen noch am denervierten Skeletmuskel der eindeutige Beweis einer Wirksamkeit des Cobamid-Coenzyms auf den Muskel erbracht werden, da die erhaltenen Ergebnisse fast alle noch innerhalb der Fehlergrenze liegen.

4. Anhand der Literatur wurden die Ergebnisse diskutiert und diese der Arbeit von MITTELBACH/PONGRATZ (48) gegenübergestellt.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ASMUSSEN, G., KIESSLING, A., WOHLRAB, F.:

   Histochemisch differenzierbare Sorten von Muskelfasern im m. latissimus dorsi des Huhnes.
   Experientia 25, 959-961 (1969)

2. BANKER, B. Q., DENNY-BROWN, D.:

   A study of denervated muscle in normal and dystrophic mice.
   J. Neurophath. Exp. Neur. 18, 517-530 (1959)

3. BARKER, H. A.:

   Structure and funktion of cobamide coenzymes.
   Fed. Proc. 20, 956-961 (1961)

4. BARKER, H. A., SMYTH, R. D., WEISSBACH, H., TOOHEY, J.I., LADD, J. N., VOLCANI, B. E.:

   Isolation and properties of cristalline cobamide coenzyme containing benzimidazole or 5,6 dimethylbenzimidazole.
   J. Biol. Chem. 235, 480-488 (1960)

5. BARKER, H. A., WEISSBACH, H., SMYTH, R. D.:

   A coenzyme containing pseudovitamin B_{12}.
   Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 44, 1093-1097 (1958)

6. BERNARD, P. M., RICHEZ, P., POUILLOUX, C.:

   Utilisation du 5,6-diméthylbenzimidazole-cobamide coenzyme chez 31 malades adultes.
   Sem. Thérap. 41, 502-504 (1965)

7. BINTLIFF, S., WALKER, B. E.:

   Radioautographic study of skeletal muscle regeneration.
   Amer. J. Anat. 106, 233-239 (1960)

8. BOWDEN, R. E., GUTMANN, E.:

   Denervation and re-innervation of human voluntary muscle.
   Brain 67, 273-313 (1944)

9. BROOKE, M. H., ENGEL, W. K.:

The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types.
2. Diseases of the upper and lower motor neuron.
Neurology (Minneap.) 19, 378-393 (1969)

10. BROOKE, M. H., ENGEL, W. K.:

The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types.
4. Children's biopsies.
Neurology (Minneap.) 19, 591-605 (1969)

11. BROOKE, M. H., ENGEL, W. K.:

The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types.
3. Myotonias myasthenia gravis and hypokalemic periodic paralysis.
Neurology (Minneap.) 19, 469-477 (1969)

12. CARO, L. G.:

"High resolution autoradiography"
in: "Methods in cell physiology" hrsg. von D. M. Prescott
Acad. Press, New York, London 1, 327- 363 (1964)

13. CHOR, H., DOLKART, R. E., DAVENPORTH, H. A.:

Chemical and histological changes in denervated skeletal muscle of the monkey and cat.
Amer. J. Physiol. 118, 580-587 (1937)

14. COATES, M. E., DORAN, B. M., HARRISON, G. F.:

Activity of vitamin B_{12} coenzymes and antagonists in the chick and developing chick embryo.
Ann. NY Acad. Sci. 112, 837-843 (1964)

15. DAVSON, D. M., ROMANUL, F. C. A.:

Enzymes in muscle.
II. Histochemical and quantitative studies.
Arch. Neurol. (Chicago) 11, 369-378 (1964)

16. DIDIER, R.:

Essais clinique du 5,6-diméthylbenzimidazole cobamide coenzyme chez le mourrisson.
Gaz. Méd. de France 73, 815-818 (1966)

17. DUBOWITZ, V., PEARSE, A. G. E.:

A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle.
Zeitschrift f. Zellforschung u. mikroskop. Anatomie, Abt. Histochemie 2, 105-117 (1960)

18. ENGEL, W. K.:

The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease.
Neurology (Minneap.)12, 778-794 (1962)

19. ENGEL, W. K., FARLIN, D. E.:

Skeletal muscle pathology in myasthenia gravis-histochemical findings.
Proceedings of the third international symposium on myasthenia gravis.
Ann. NY Acad. Sci. 135, 68-78 (1966)

20. ENGEL, W. K., BROOKE, M. H., NELSON, P. G.:

Histochemical studies of denervated or tenotomized cat muscle.
Ann. NY Acad. Sci. 138, 160-185 (1966)

21. ERBSLÖH, F., DIETEL, W.:

Die Bedeutung der Muskelbiopsie bei den sog. Kollagenosen.
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 65, 371-376 (1959)

22. FAVAREL-GARRIGUES, J. C., CARDINAUD, J. P.:

Essai clinique du 5,6 dimethylbenzimidazole-cobamide coenzyme en réanimation respiratoire.
J. Med. Bordeaux 143, 1775-1781 (1966)

23. FISCHER, E., RAMSEY, V. W.:

Changes in protein content and in some physico-chemical properties of the protein during muscular atrophies of various types.
Amer. J. Physiol. 145, 571-582 (1945/46)

24. FONTAINE, G., FARRIAUX, J. P.:

Essai clinique d'un anabolisant non stéroide en pédiatrie: l'héraclène.
Lille Med. 11, 616-618 (1966)

25. GALE, E. F., FOLKES, J. P.:

The assimilation of amino acids by bacteria.
20. The incorporation of labelled amino acids. by disrupted staphylococal cells.
Biochem. J. 59, 661-675 (1955)

26. GUTMANN, E.:

Denervations u. Inaktivitätsatrophie der Skelettmuskulatur.
Ärztl. Forsch. 23, 33-44 (1969)

27. HETTINGER, T. H., MÜLLER-WECKER, H.:

Histologisch und chemische Veränderungen der Skeletmuskulatur bei Atrophie.
Arb. Phys. 15, 459-465 (1954)

28. HINES, H. M., KNOWLTON, G. C.:

Changes in the skeletal muscle of the rat following denervation.
Amer. J. Physiol. 104, 379-391 (1933)

29. HIRSCH, TH. v., BOELLAARD, J. W.:

Methacrylsäureester als Einbettungsmittel in der Histologie.
Z. wiss. Mikroskopie 64, 24-29 (1958)

30. HOAGLAND, M. B., KELLER, E. B., ZAMECNIK, P. C. J.:

Enzymatic carboxyl activation of amino-acids.
J. Biol. Chem. 218, 345-358 (1956)

31. HOGENKAMP, H. P.:

Structure and chemical reactions of the cobamide coenzymes.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 112, 552-564 (1964)

32. JAMIN, F.:

Experimentelle Untersuchungen zur Lehre von der Atrophie gelähmter Muskel.
Habil. Schrift, Erlangen (1904)

33. JERUSALEM, F., LESCH, R., NOETZEL, H.:

Autoradiographische Untersuchungen über die Regeneration am denervierten Rattenmuskel.
Dt. Zeitschrift für Nervenheilkunde 194, 128-141 (1968)

34. JOHNSON, A. W., SHAW, N.:

Some structural observations on the vitamin B_{12} coenzyme.
Proc. Chem. Soc. 420-421 (1960)

35. JUNKMANN, K., SUCHOWSKY, G. K.:

Untersuchungen anabol wirksamer Steroide.
Arzneimittelforschung 12, 214-218 (1962)

36. KNOLL, P., HAUER, H.:

Über das Verhalten der protoplasmaarmen und der protoplasmareichen quergestreiften Muskelfasern unter pathologischen Verhältnissen.
Sitz. Akad. Wiss. Wien, math. nat. Classe 101, 315-328 (1892)

37. KOCHAKIAN, C. D., MURLIN, J. R.:

Effect of male hormone on protein and energy metabolism of castrate dogs.
J. Nutrit. 10, 437-459 (1935)

38. KOHN, R. R.:

Mechanism of protein loss in denervation muscle atrophy.
Amer. J. Path. 45, 435-447 (1964)

39. KOHN, R. R.:

Denervation muscle atrophy - an autolytic system in vitro.
Amer. J. Path. 47, 315-323 (1965)

40. KOWALSKI, K., GORDON, E. E., MARTINEZ, A., ADAMEK, J.:

Changes in enzyme activities of various muscle fiber types in rat induced by different exercices.
J. Histochem. Cytochem. 17, 601-607 (1969)

41. KRÜSKEMPER, H. L.:

Anabole Steroide.
Monographie, Thieme-Verlag, Stuttgart (1963)

42. KUMAMOTO, T., KIMURA, M., YATA, Y., HANDA, Y.:

Correlated biochemical, histochemical and electron microscopie studies on fiber types in striated muscles of rat.
Wakayama Med. Rept. 12, 13-28 (1967)

43. LANGE, W.:

Zur Differenzierung der "roten" und "weißen" Muskulatur mit der Methode nach Okamoto et al.
Acta histochem. 32, 244-246 (1969)

44. LENHERT, P. G., HODGKIN, D. C.:

Structure of the 5,6-dimethylbenzimidazolyl-cobamide coenzyme.
Nature (London) 192, 937-938 (1961)

45. MARTIN, Cl., BEAUVIEUX, Y. J.:

Intérét du cobamide coenzyme en pédiatrie.
Sem.des.Hop.(Ann.Pédiatrie)12, 482-486 (1965)

46. MATTERN, C. F. T.:

Preliminary crystallographie investigations of 5,6-dimethylbenzimidazole cobamide coenzyme.
J. Biol. Chem. 235, 489-491 (1960)

47. MEYER, F., ZALAT, J. P.:

Stimulation de l'incorporation des acides aminés dans les protéins de réticulocytes de lapin par la 5,6-diméthylbenzimidazolylcobamide-coenzyme.
C. R. Acad. Sc. Paris 260, 291-294 (1965)

48. MITTELBACH, F., PONGRATZ, D.:

Über den Einfluß anaboler Steroide auf den normalen und denervierten Skeletmuskel.
Virchows Arch. Path. Anat. Abt. A 344, 275-285 (1968)

49. NACHLASS, M. M., WALKER, D. G., SELIGMAN, A. M.:

Histochemical method for the demonstration of DPN-diaphorase.
J. biophys. biochem. Cythol. 4, 29-38 (1958)

50. NACHMIAS, V. T., PADYKULA, H. A.:

A histochemical study of normal and denervated red and white muscle of the rat.
J. biophys. Biochem. Cytol. 4, 47-54 (1958)

51. OEHLERT, W.:

Durchführung und Anwendungsmöglichkeiten der autoradiographischen Methode in der Pathologie.
Schweiz. med. Wschr. 94, 1009-1015 (1964)

52. PADYKULA, H. A.:

The localization of succinic dehydrogenase in tissue section of the rat.
Amer. J. Anat. 91, 107-132 (1952)

53. PADYKULA, H. A., HERMAN, E.:

The specifity of the histochemical method for adenosintriphosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 3, 170-195 (1955)

54. POULET, J., GAULTIER-GIGNOUX, Cl.:

Action anabolisante du dibencozide: et étude portant sur 38 malades.
Vie Médicale 47, 305-309 (1966)

55. PRESCOTT, D. M.:

"Autoradiography with liquid emulsion" in:
"Methods in cell physiology" hrsg. von
D. M. Prescott
Acad. Press, New York, London 1, 365-370 (1964)

56. RODECK, H.:

Der Kalium-Haushalt im kranken Muskel.
Schweizer med. Wschr. 83, 1137-1139 (1953)

57. ROMANUL, F. C., HOGAN, E. L.:

Enzymatic changes in denervated muscle.
I. Histochemical studies.
Arch. Neurol. 13, 263-273 (1965)

58. ROMANUL, F. C.:

Enzymes in muscle. I. Histochemical studies of enzymes in individual muscle fibers.
Arch. Neurol. 11, 355-368 (1964)

59. SCHMIDT, C. G., SCHLIEF, H.:

Untersuchungen über das Cytochrom- und Succinoxydasesystem des Skeletmuskels bei neurogener Atrophie.
Zeitschr. ges. exp. Med. 127, 53-61 (1956)

60. SCHROEDER, H.:

Die Vitamine in der anabolen Therapie.
Physik. Medizin u.Rehabilitation 9, 199-201(1966)

61. SILLANPÄÄ, M., TURKU:

Über den Einfluß von parenteral und per os verabreichtem Vitamin B_{12} auf den Gewichtsanstieg von Frühgeborenen.
Kinderärztl. Praxis 33, 299-302 (1965)

62. STEIN, J. M., PADYKULA, H. A.:

Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat.
Am. J. Anat. 110, 103-115 (1962)

63. SUNDERLAND, S., RAY, L. J.:

Denervation changes in mammalian striated muscle.
J. Neurol.Neurosurg.and Psych. 13, 159-177(1950)

64. TOWER, S. S.:

Atrophy and degeneration in skeletal muscle.
Amer. J. Anat. 56, 1-43 (1935)

65. WAGLE, S. R., MEHTA, R., JOHNSON, B. C.:

Vitamin B_{12} and protein biosynthesis.
IV. In vivo and in vitro studies.
J. Biol. Chem. 230, 137-147 (1958)

66. WAGLE, S. R., MEHTA, R., JOHNSON, B. C.:

Relation of vitamin B_{12} to amino acid activation.
J. Biol. Chem. 233, 619-624 (1958)

67. WAREMBOURG, H., DELOMEZ, M.:

Résultats de l'expérimentation clinique du 5,6-diméthylbenzimidazole-cobamide coenzyme (Indusil).
Lille Med. 11, 734-736 (1966)

68. WECHSLER, W., HAGER, H.:

Elektronenmikroskopische Befunde bei Muskelatrophie nach Nervendurchtrennung bei der weißen Ratte.
Beitr. path. Anat. 125, 31-53 (1961

69. WEISSBACH, H. J., LADD, J. N., VOLCANI, B. E., SMYTH, R. D., BARKER, H. A.:

Structure of the adenylcobamide coenzyme: degradation by cyanide acid and light.
J. Biol. Chem. 235, 1462-1473 (1960)

70. WEISSBACH, H., TOOHEY, J., BARKER, H. A.:

Isolation and properties of B_{12}-coenzymes containing benzimidazole or dimethylbenzimidazole.
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 45, 521-525 (1959)

71. WILLARD, W. A., GRAW, E. C.:

Some histological changes in striated skeletal muscle following nerve section.
Anat. Rec. 27, 192 (1924)

Herrn Professor Dr. med. Franz MITTELBACH gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit.

L E B E N S L A U F

Am 29.5.1939 wurde ich als Sohn des Bundesbahnbediensteten Josef Husch und seiner Ehefrau Juliana geb. Krtscha in Wien geboren.

Nach der Vertreibung aus dem Sudetenland besuchte ich von 1946 bis 1951 die Volksschule in Röhrmoos Krs. Dachau. Im Jahre 1957 trat ich, nach 6-jährigem Besuch der Ludwigsoberrealschule in München, in die Chemiefachschule Dr. Elhardt ein und legte dort nach fünf Semestern die Prüfung als Chemotechniker ab. Nach mehrjähriger Tätigkeit als Chemotechniker in der Medizin. Klinik, der Firma Farbwerke Hoechst und dem Max-Planck-Institut für Biochemie, entschloß ich mich die Reifeprüfung nachzumachen. Im Sommersemester 1966 begann ich nach bestandenem Abitur das Medizinstudium an der Universität München. Hier legte ich nach fünf vorklinischen Semestern im Okt. 1968 die ärztliche Vorprüfung ab.

Vorliegende Doktorarbeit begann ich im Dez. 1968 und beendete sie im Sept. 1970.

Mein Studium beendete ich mit dem medizin. Staatsexamen im Dez. 1971.